FLUORESZENZ-UNTERSUCHUNGEN AN BIMOLEKULAREN LIPID-CHLOROPHYLL-MEMBRANEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der Universität Basel

von

Nasser Alamuti

aus

Ghazwin / Iran

1971

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0090

FLUORESZENZ-UNTERSUCHUNGEN AN BIMOLEKULAREN LIPID-CHLOROPHYLL-MEMBRANEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der Universität Basel

von

Nasser Alamuti

aus

Ghazwin / Iran

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag der Herren Professoren P. Läuger und M. Thürkauf

Basel, den 10. 11. 1970

Dekan

Prof. Dr. S. Fallab

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Buchdruckerei Bader, Wehr

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. Läuger, danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gebührt auch den Herren Dürr und Haschlar für den Bau des mechanischen Teiles der Apparatur.

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 1

2. Herstellung und allgemeine Eigenschaften "schwarzer" Chlorophyll-Membranen

2.1 Ausgangsmaterial 3
2.2 Herstellung der Membranen 4
2.3 Elektrische Leitfähigkeit 5
2.4 Bestimmung der Membrandicke aus Kapazitätsmessungen 6

3. Fluoreszenzmessungen 8

3.1 Beschreibung der Apparatur
3.2 Zeitlicher Verlauf der Floureszenzintensität bei der Bildung der Membrane 12
3.3 Floureszenzspektrum 13
3.4 Eichung der Meßmethode 16

4. Floureszenzlöschung

4.1 Konzentrationslöschung 18
4.2 Löschung durch Fremdstoffe 19

5. Einseitige chemische Zerstörung des Chlorophylls in der Membrane 20

6. Polarisationsmessungen 22

7. Diskussion der Ergebnisse 24

8. Zusammenfassung 27

9. Literatur-Verzeichnis 28

Einleitung

Untersuchungen über die Photosynthese in grünen Pflanzen haben gezeigt, daß der photosynthetische Apparat in bestimmten Zellorganellen, den Chloroplasten, lokalisiert ist[1)], welche einen hohen Grad molekularer Ordnung besitzen. Die photosynthetischen Pigmente, vor allem das Chlorophyll, scheinen in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten in monomolekularen Schichten angeordnet zu sein, welche mit mono- bzw. bimolekularen Schichten von Proteinen und Phospholipiden abwechseln[2)]. Derartige räumlich geordnete Systeme besitzen bekanntlich Eigenschaften, welche nicht mehr in einfacher Weise aus den Eigenschaften der Einzelmoleküle abgeleitet werden können. So dürfte auch der hohe Wirkungsgrad der Photosynthese zum Teil darauf beruhen, daß die beteiligten funktionellen Moleküle in definierten räumlichen Sequenzen angeordnet sind.
Der Primärprozeß der Photosynthese besteht in der Umwandlung der in den photosynthetischen Pigmenten absorbierten elektromagnetischen Energie in freie chemische Energie[3)]. Dabei wird mit der Energie des sichtbaren Lichtes letzten Endes Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten. Gleichzeitig mit der Wasserspaltung wird aus ADP (Adenosindiphosphat) und Phosphat energiereiches ATP (Adenosintriphosphat) gebildet, und der Wasserstoff wird auf TPN (Triphosphopyridinnukleotid) übertragen. TPNH (reduziertes Triphosphopyridinnukleotid) und ATP reduzieren dann in einer Dunkelreaktion CO_2 zu Zucker. Der Reaktionsweg vom CO_2 zum Zucker ist gut bekannt [4)]; dagegen sind die einzelnen Schritte des Primärprozesses noch nicht vollständig geklärt. Es erscheint daher sehr interessant, künstliche Systeme zu untersuchen, in denen das Chlorophyll in möglichst ähnlicher Weise wie in den Thylakoidmembranen molekular geordnet vorliegt.

Wie es sich gezeigt hat, lassen sich mit Phospholipiden, wie z.B. Lecithin, in wässriger Lösung bimolekulare, etwa 100 Å dicke Membranen herstellen[5-7)], bei denen die Kohlenwasserstoffketten das Innere der Membran bilden, während der polare Teil des Lecithinmoleküls dem wässrigen Außenmedium zugewandt ist. Es ist zu erwarten,

daß Chlorophyllmoleküle aufgrund ihrer besonderen strukturellen Eigenschaften (Kombination der apolaren Phytyl-Seitenkette mit dem polaren Porphyrin-Ringsystem) in die bimolekulare Membran eingebaut werden können. Da Chlorophyll bei Bestrahlung mit blauem Licht eine rote Fluoreszenzstrahlung aussendet, sollte sich die Bildung gemischter Chlorophyll-Lecithinmembranen mit empfindlicher photometrischer Methode nachweisen lassen.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, eine Anlage zu konstruieren, mit deren Hilfe die Existenz der obengenannten Systeme nachgewiesen und ihre Eigenschaften untersucht werden konnten.

Ausgangsmaterial

Bei der Durchführung der Experimente wurden als Lipide Ei-Lecithin oder synthetisches Dioleoyl-Lecithin verwendet. Ei-Lecithin wurde nach der Methode von Pangborn[8] aus Eidotter extrahiert und bei der Temperatur von -18° C unter Stickstoff in absolutem Alkohol als ein-prozentige Lösung aufbewahrt.

Dioleoyl-Lecithin wurde in Anlehnung an die Methode von E.C.Robles und D.Van den Berg[9] synthetisiert. Das Reaktionsprodukt wurde auf einer Kieselgel-Säule gereinigt (Lösungsmittel: Chloroform mit Zusatz steigender Mengen von Methanol). Fraktionen von jeweils 20 ml wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers (LKB) gesammelt und durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Der Lecithin-Peak lag zwischen 40 % und 60 % Methanol in Chloroform. Für die Membranversuche wurden die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen verwendet.

Chlorophyll a war ein kommerzielles Produkt (Fluka) und wurde nicht weiter gereinigt. Die Reinheit der Chlorophyll-Lösungen wurde von Zeit zu Zeit durch das Absorptionsspektrum kontrolliert. Das Verhältnis der Extinktionen beim Blau- und Rot-Peak stimmte mit dem in Literatur angegebenen Wert überein[10, 11] (Fig.1).

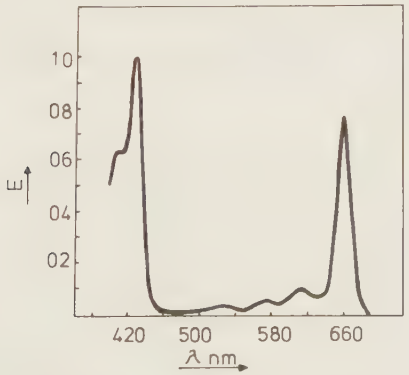


Fig.1 : Absorptionsspektrum von $0{,}95 \cdot 10^{-6}$ M Chlorophylla in Benzol

$$\frac{E\ (432\ nm)}{E\ (665\ nm)} = 1{,}3$$

(E = Extinktion)

Herstellung der Membranen

Zur Herstellung der Lecithin/Chlorophyll-Membran wurde wie folgt verfahren: Zunächst wurde eine Lösung von 0,5 % (W/V) Lecithin in n-Dekan unter Zusatz der jeweils gewünschten Chlorophyll-Menge hergestellt (Molares Verhältnis Chlorophyll a : Lecithin = y ; $0{,}01 \leq y \leq 2$). Die Membran wird an einer Teflonblende erzeugt, in die ein kreisförmiges Loch vom Durchmesser 8 mm gestanzt ist. Die Teflonblende ist in der Diagonalen einer Glasküvette der inneren Abmessungen 20 x 20 x 30 mm montiert. Die Glasküvette enthält eine wässrige KCL-Lösung der Konzentration 0,1 M. Es wird soviel Salzlösung in die Küvette gegeben, daß sich der obere Rand der Membran 2 - 3 mm unterhalb der Wasseroberfläche befindet. Mit einer Injektionsspritze, an deren Spitze ein Teflonschlauch montiert ist, wird eine kleine Menge der Lipid-Lösung entnommen und damit über dem Loch eine Lamelle aufgezogen, die zunächst einige μ dick ist[12]. Die Lamelle reflektiert einen Teil des eingestrahlten Lichtes und kann dadurch mit Hilfe eines Fernrohres beobachtet werden. Im reflektierten Licht treten Interferenz-Farben auf (ähnlich wie bei dünnen Seifenlamellen in Luft)[13]. Nach etwa einer Minute erscheinen dunkle Felder auf der Lamelle (vergl. Fig.2), welche sich ausbreiten und nach weiteren ca. 20 - 30 Minuten die gesamte Fläche einnehmen. Die Dicke des "schwarzen" Filmes beträgt etwa 70 Å (siehe Abschnitt 2 - 4) und entspricht damit etwa dem Zweifachen der Länge eines Lecithin-Moleküls.

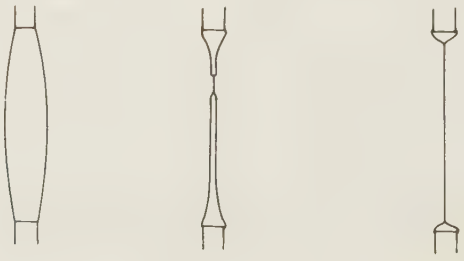


Fig. 2 : Schema der Membranbildung

A: Die Lamelle unmittelbar nach dem Aufziehen
B: Bunte Membran mit schwarzem Feld
C: Schwarze Membran

Elektrische Leitfähigkeit der Membrane

Es wurde die Leitfähigkeit von Chlorophyll/Lecithin-Membranen als Funktion der Zusammensetzung in wässriger KCL der Konzentration 0,1 M gemessen. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Spannungsteilers und eines Ampèremeters (Keithley) durchgeführt. Die angelegten Spannungen waren in der Größenordnung von 20 - 30 mV, was etwa dem ohm'schen Bereich der Strom-Spannungs-Charakteristik der Membran entspricht[14].

Fig. 3 zeigt die Membranwiderstände bei einer Spannung von 25 mV. Die Widerstände waren, ebenso wie bei reinen Lipidmembranen, sehr hoch und lagen im Bereich 10^6 - 10^8 cm^2. Dieser hohe Widerstand steht mit der Vorstellung in Einklang, daß das Membraninnere im wesentlichen Kohlenwasserstoffcharakter hat.

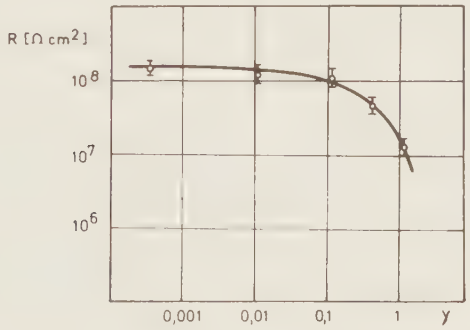


Fig.3 : Elektrischer Widerstand der Membran als Funktion des Chlorophyll a : Lecithin-Verhältnisses (0,1 M KCI)

Bestimmung der Membrandicke aus Kapazitätsmessungen

Zur Bestimmung der Membrandicke wurden Kapazitätsmessungen herangezogen. Die hierfür benutzte Meßanordnung wurde bereits früher beschrieben (P.Läuger et. al.[14]).

Die Messungen ergaben, daß die Kapazität innerhalb der Fehlergrenzen vom Mischungsverhältnis ($0{,}06 < y < 2$) unabhängig ist und einen Wert von $C = 0{,}41 \pm 0{,}04\ \mu F/cm^2$ besitzt. Nach Abschluß der Bildung des schwarzen Filmes nimmt die Kapazität in der Regel noch zu und erreicht nach ca. 200 Minuten den stationären Endwert (Fig. 4).

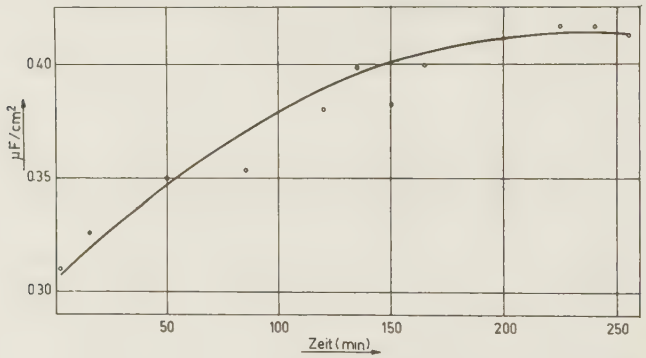


Fig. 4 : Spez.Kapazität von Chla/Lec Bilayermembran
1 : 8 0,1 m KCL

Aus der Beziehung für die Kapazität C eines Plattenkondensators der Fläche 1

$$C = \varepsilon_m / 4\pi d$$

läßt sich die Membrandicke d aus dem gemessenen Wert von C berechnen. Setzt man für die Dielektrizitätskonstante den Wert $\varepsilon_m = 2$ (entsprechend der DK eines Kohlenwasserstoffs), so ergibt sich die Membrandicke zu 50 Å. Dieser Rechnung liegt die Vorstellung zugrunde,

daß die Kohlenwasserstoffketten der Lipide das Innere der Membran bilden, während die polaren Gruppen der äußeren Elektrolyt-Lösung zugewandt sind (Fig. 5).

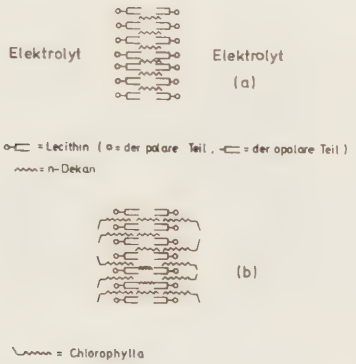


Fig. 5 : (a) Struktur der bimolekularen Lipidmembran
(b) Lipid/Chlorophyll-Membran

Für die Struktur der Chlorophyll/Lecithin-Membran ergibt sich dann etwa das in Fig. 5 skizzierte Bild. Eine experimentelle Begründung dafür, daß die Porphyrinringe der Chlorophyllmoleküle in den beiden Membran-Grenzflächen lokalisiert sind, wird in Abschnitt 5 gegeben.

Fluoreszenzmessungen

Die experimentelle Anordnung geht aus der Fig. 6 hervor.

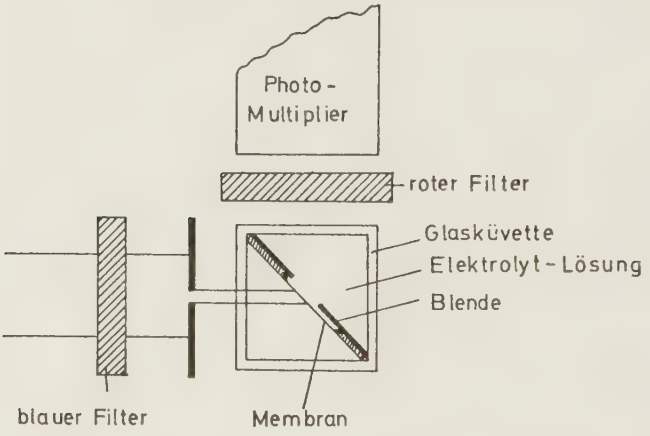
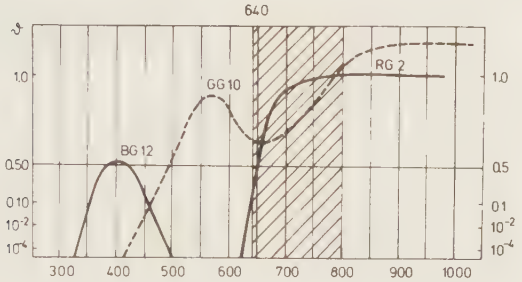


Fig. 6 : Experimentelle Anordnung für Fluoreszenzmessungen an bimolekularen Membranen

Das Licht einer Quecksilberhöchstdrucklampe (OSRAM HBO 200 W L 1) trifft nach Durchtritt durch ein optisches Linsensystem und einen Blaufilter (BG 12 Schott und Gen.) auf die Membran auf. Die Flächennormale der Membran bildet mit der Richtung des Lichtstrahles einen Winkel von 45°. Das Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe eines speziell rotempfindlichen Photomultipliers (Philips 56 TVP), der senkrecht zur Richtung des Anregungslichtes angeordnet ist, gemessen. Vor dem Photomultiplier befindet sich ein Rotfilter (RG 2), kombiniert mit einem Gelbfilter (GG 10); beide von Schott und Gen. Das Filter GG 10 wurde dem Rotfilter vorgeschaltet, weil es sich gezeigt hatte, daß das Rotfilter selbst durch blaues Streulicht zur Fluoreszenz angeregt wird. Durch diese Filterkombination konnte das Streulicht völlig unterdrückt werden. Unmittelbar hinter der Membran ist eine Blende mit kreisförmiger Öffnung vom Durchmesser 4 mm ange-

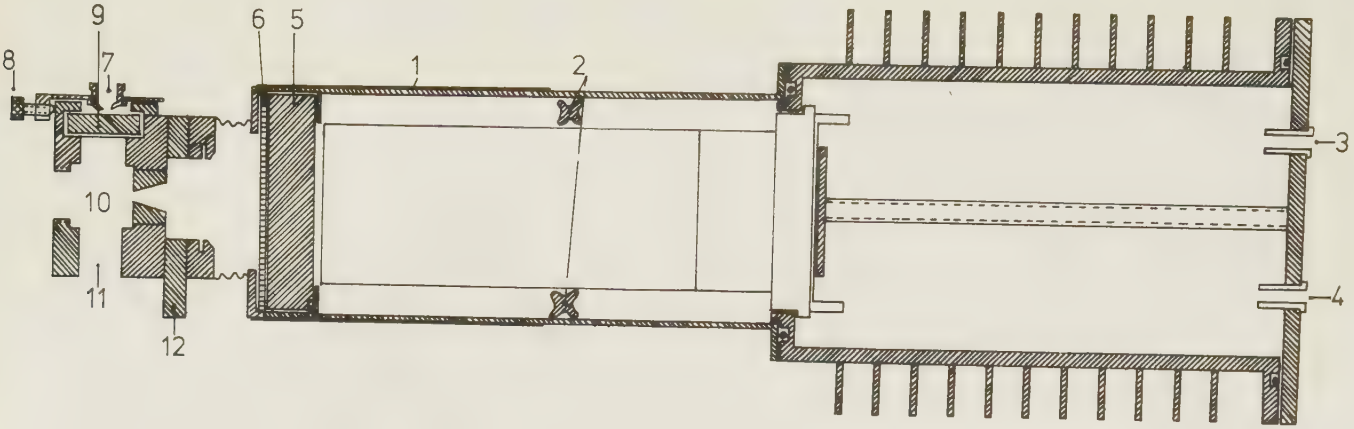
bracht, welche den Randwulst ausblendet. Die spektrale Verteilung der Filter und der gesamte Aufbau sind in Fig. 7 und Fig. 8 gegeben.



Filter:	Dicke (mm):
BG 12	10
GG 10	3
RG 2	18

Fig. 7 : Transmissionskurve der benutzten Filterkombination.
Schraffierter Bereich zeigt den Bereich der Chlorophyll-Fluoreszenz

PM 56 TVP
(Phillips)



1: μ-Metall
2: Teflonstütze
3: Hochspannungseingang
4: Ausgang
5: R G 2
6: G G 10
7: Lichteintritt
8: Verstellschraube
9: B G 12
10: Membran
11: Rayleighhorn
12: Interferenzfilter (Einschiebevorrichtung)

Fig.: Der mechanische Aufbau der Apparatur zur Fluoreszenzmessung an Biomolekülen (Kapitel II, Abb. [illegible]).

Die für den Photomultiplier erforderliche Spannung wurde durch ein John-Fluke-Netzgerät (405 B) erzeugt. Sie betrug in der Regel 2,1 KV, wobei die Photokathode der Minuspol war, und die Anode über einen Vorschalt-Widerstand an das Erdpotential des Netzgerätes angeschlossen wurde. Bei dieser Spannung war das Signal/Rausch-Verhältnis am günstigsten. Der Photomultiplierausgangsstrom wurde mit Hilfe eines Keithley-Ampèremeters gemessen.

Die Intensität der Lichtquelle wurde während des Versuches ständig kontrolliert. Hierzu wurde mit einer teildurchlässigen Platte ein Teil des Anregungslichtes auf eine Photozelle (Valvo 150 AV) gelenkt.

Die absolute Lichtintensität, die auf die Membran auffällt, wurde mit Hilfe einer Thermosäule (Hilger und Watts FT 16,1/606) der Empfindlichkeit 26 μ V/μW gemessen und betrug etwa 500 erg/cm^2·Sec. Das Photomultiplierausgangssignal bei den Fluoreszenzversuchen war proportional der auffallenden Lichtintensität. Die Membran wurde nur während der eigentlichen Messung bestrahlt.

Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Bildung der Membrane

Wie vorher besprochen wurde, ist die Membran in der ersten Phase eine ziemlich dicke Lamelle (~1 µ). Deshalb ist unmittelbar nach dem Aufziehen der Lamelle die Intensität des Fluoreszenzlichtes sehr hoch (Fig. 9).

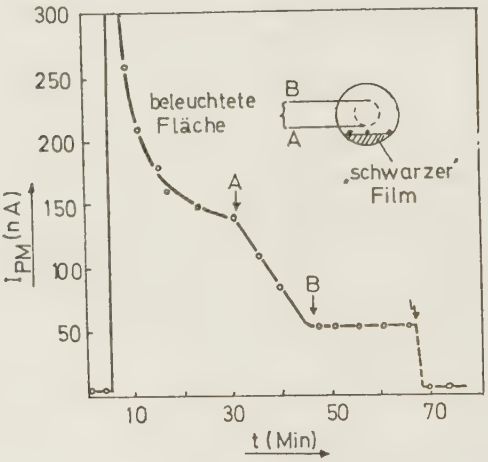


Fig. 9 : Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Bildung der Membran.
In Punkt A erreicht schwarzer Film belichtete Fläche; in Punkt B ganze belichtete Fläche in schwarzem Zustand (y = 0,2)

Die Intensität nimmt in der Folge zunächst rasch, dann langsamer ab. Wenn der schwarze Bezirk die beleuchtete Fläche erreicht hat, beobachtet man einen Knick in der Intensität/Zeit-Kurve, worauf das Signal steil abnimmt und schließlich einen während der Lebensdauer der Membran (bis zu 18 Stunden) konstanten Endwert erreicht. Nach dem Zerstören der Membran mit Hilfe zweier Platinelektroden, an die man eine Gleichspannung (einige Volt) legt, sinkt das Ausgangssignal bis auf den Dunkelstrom ab.

Fluoreszenzspektrum

Mit Hilfe eines Satzes von Interferenzfiltern (Balzers) wurde die spektrale Verteilung des Fluoreszenzlichtes der Membran ermittelt. Die Filter sind in einem Filterhalter eingebaut und erfassen den Bereich des Fluoreszenzlichtes von Chlorophyll a (640-790 nm). Die Halbwertsbreite der Filter beträgt ca. 10 nm und ihre Transmissionspeaks, λ_p, liegen etwa 15 nm auseinander. Sie wurden der Reihe nach in den Strahlengang zwischen Membran und Photomultiplier eingeschoben (Vergl.Fig. 8); dabei wurde der jeweilige Photomultiplierstrom gemessen. Das relative Photomultipliersignal S_i in Gegenwart des Interferenzfilters i ist definiert durch

$$S_i = \frac{\text{Photomultiplierstrom mit Interferenzfilter}}{\text{Photomultiplierstrom ohne Interferenzfilter}}$$

Die spektrale Verteilung des Fluoreszenzlichtes, $E(\lambda)$, kann durch die Beziehung

$$S_i = c \int_0^\infty E(\lambda)\, R(\lambda)\, T_i(\lambda)\, d\lambda$$

ermittelt werden, wobei $R(\lambda)$ die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers mit vorgeschalteter Filterkombination GG 10 + RG 2, $T_i(\lambda)$ die Transmission des i-ten Filters und c einen konstanten Normierungsfaktor bedeuten (A.G.Tweet et al.[15]). Die Transmissionskurven $T_i(\lambda)$ wurden von Balzers geliefert. $R(\lambda)$ wurde aus den Firmendaten für die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers und aus der Transmissionskurve der Filterkombination bestimmt (Fig. 10).

Die Konstante c ist so gewählt, daß das Maximum von $E(\lambda)$ den Wert 1 besitzt. Die obige Gleichung enthält demnach bis auf $E(\lambda)$ nur bekannte Größen. In erster Näherung wurde $E(\lambda)$ im jeweiligen Wellenlängenbereich des Interferenzfilters i als konstant angenommen, woraus sich ein stufenförmiger Verlauf für $E(\lambda)$ ergab. Aus diesem wurde dann ein aus Geraden variabler Steigung bestehender Kurvenzug konstruiert. Die Konstruktion wird in der Weise durchgeführt, daß

der Wert des Integrals und die gemessenen S_i-Werte angenähert gleich werden.

Fig. 11 zeigt die so erhaltene Verteilung für das Chlorophyll/Lecithin-Verhältnis y = 0,1. Die dazugehörigen S_i-Werte sind in der Tabelle angegeben.

i	1	2	3	4	5	6	7	8
λ_p (nm)	641	654	668	685	701	717	730	745
S_i (gemessen)	0,006	0,019	0,075	0,112	0,038	0,025	0,012	0,006
S_i (berechnet)	0,003	0,012	0,055	0,114	0,042	0,028	0,011	0,004

Das Hauptmaximum erscheint bei der Wellenlänge 685 nm. Die Nebenmaxima, die von A.G.Tweet et al.[15] bei der Untersuchung von Chlorophyll-Monoschichten an der Grenzfläche Wasser/Luft gefunden wurden, gehen hier in eine Schulter über.

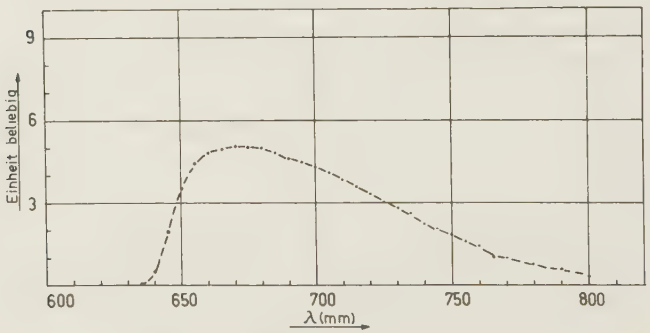


Fig. 10 : Transmissionskurve der Filterkombination RG 2 + GG 10, multipliziert mit der spektralen Empfindlichkeit des Photomultipliers als Funktion der Wellenlänge.

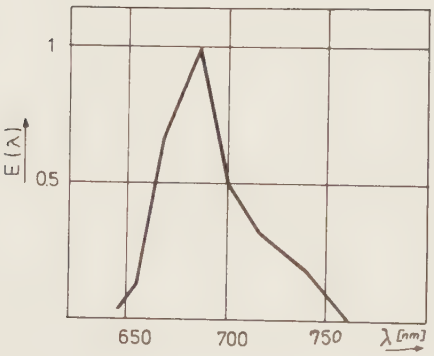


Fig. 11 : Spektrale Verteilung von Chlorophyll a-Fluoreszenz in der schwarzen Membran für y = 0,1 in n-Dekan

Eichung der Meßmethode

Um die Anzahl Chlorophyll-Moleküle, die in der Membrane eingebaut sind, zu bestimmen, wurde nach jeder Messung das Signal der Membrane mit dem Signal einer Chlorophyll-Lösung bekannter Konzentration verglichen. Die Membrane wurde dabei durch eine Mikro-Küvette von 0,25 mm optischer Weglänge ersetzt, welche eine hochverdünnte Chlorophyll-Lösung (in Äthanol) enthielt. Da die Fluoreszenz-Quantenausbeute, $\emptyset$, des Chlorophyll a praktisch unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels ist (C.S.French[12]), darf man näherungsweise annehmen, daß $\emptyset$ den gleichen Wert besitzt, unabhängig davon, ob die Chlorophyll-Moleküle in Äthanol gelöst oder in der Lipid-Membrane eingebaut sind.
Diese Eichmethode ist aber nur bei kleinen Chlorophyll-Konzentrationen gültig, bei denen in der Membrane noch keine Konzentrationslöschung auftritt. Da bei Chlorophyll-Lecithin-Verhältnissen $y < 0{,}1$ die Fluoreszenzintensität proportional zu y ist (Fig. 12), kann in diesem Bereich die Konzentrationslöschung zumindest näherungsweise vernachlässigt werden. Damit ergeben sich für die Anzahl der eingebauten Chlorophyll-Moleküle pro cm^2 der Membrane N folgende Zahlen:

y :	0,02	0,05	0,1
N :	$6{,}5 \cdot 10^{11}$	$1{,}5 \cdot 10^{12}$	$4 \cdot 10^{12}$

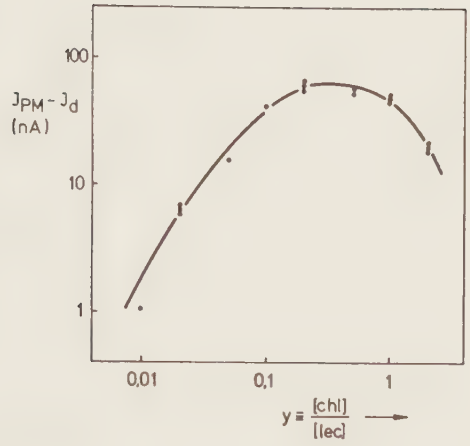


Fig. 12 : Fluoreszenz vom schwarzen Film in Abhängigkeit von dem Mischungsverhältnis Chlorophyll/Lecithin in n-Dekan , J_d = Dunkelstrom

Konzentrationslöschung der Fluoreszenz

Bei schrittweiser Vergrößerung des Chlorophyll-Lecithin-Verhältnisses durchläuft die Fluoreszenzintensität ein Maximum und nimmt oberhalb von y = 0,1 wieder ab (Fig. 12).
Da die spektrophotometrischen Versuche (A.Steinemann, 1970)[17] gezeigt haben, daß die Chlorophyllkonzentration in der Membrane auch oberhalb von y = 0,1 noch ansteigt, deutet diese Erscheinung darauf hin, daß bei größerer Chlorophyll-Konzentration eine Konzentrationslöschung stattfindet. Dies stimmt mit den Untersuchungen an Chlorophyll in Monoschichten von Tweet et al.[15] überein, die eine starke Floureszenzintensitätsabnahme oberhalb der Chlorophyll-Konzentration, bei der die mittleren Abstände von Pigmenten etwa 50 Å unterschreiten, beobachtet haben.
Wenn man anhand der Eichmethode die Anzahl der Chlorophyll-Moleküle in der Membrane unter der Voraussetzung eines Fehlens der Konzentrationslöschung berechnet, ergibt sich für $y > 0{,}1$ ein Abstand < 70 Å, bei dem eine Konzentrationslöschung beobachtet werden kann.
Fig. 13 zeigt die relative Fluoreszenzausbeute.

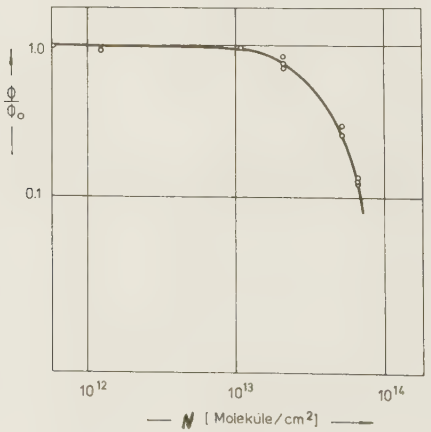


Fig. 13 : Relative Fluoreszenzausbeute von Chlorophyll a in Lecithin-Membranen

Auf den Mechanismus der Konzentrationslöschung infolge der intermolekularen Energieübertragung wird in der Diskussion eingegangen.

Fluoreszenzlöschung durch Fremdstoffe

In den Chloroplasten kommt eine Anzahl von Quinonen vor, die für den Ablauf der Photosynthese eine Rolle spielen[18-20]. Eines dieser in der Natur vorkommenden Quinone ist Vitamin K_1 (2-Methyl-3-Phytyl 1,4 Naphtoquinone). Bei Untersuchungen an Chlorophyll/Oleoylalkohol-Monoschichten an der Wasseroberfläche haben G.L.Gaines et al.[21] festgestellt, daß die Chlorophyll-fluoreszenz durch Zusatz von Vitamin K_1 teilweise gelöscht wird. Es erschien daher interessant zu untersuchen, ob ein Energie-übergang von Chlorophyll auf Vitamin K_1 auch in der Membrane auftritt. Vitamin K_1, welches praktisch wasserunlöslich ist, wurde der Stammlösung Chlorophyll a/Lecithin zugesetzt.
Fig. 14 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute von der Vitamin-K_1-Konzentration in der für die Membranbildung verwendeten Lösung.

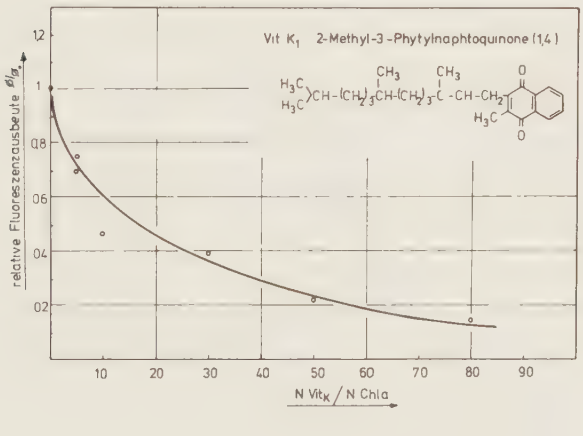


Fig. 14 : Relative Fluoreszenzausbeute unter Berücksichtigung der Eigenlöschung und der Abnahme der Chlorophyll-Konzentration in der Membran bei Zusatz von Vitamin K_1 in membranbildender Lösung.

Einseitige chemische Zerstörung des Chlorophylls in der Membrane

Um festzustellen, ob die eingebauten Chlorophyll-Moleküle auf den beiden Grenzflächen der Membrane verteilt sind oder in der Membrane gelöst vorliegen, wurde versucht, die Chlorophyll-Moleküle einseitig zu zerstören und dies anhand der Fluoreszenzabnahme zu beobachten. Die Zerstörung der Chlorophyll-Moleküle wurde mit Hilfe des starken Oxidationsmittels (Kaliumperoxodisulfat, $K_2 S_2 O_8$) durchgeführt. Aus Leitfähigkeitsmessungen ist bekannt, daß die Permeabilität der Lipid-Membrane für die zwei-wertigen Ionen sehr klein ist. Wird das Reagens der einen Außenphase zugesetzt, so kann daher die chemische Reaktion nur auf der einen Seite erfolgen. Nachdem die Lamelle schwarz war, wurde mit Hilfe von Injetionsspritzen gleichzeitig in die eine Kammer wässrige Peroxodisulfat + KCL-Lösung (Endkonzentration 25 mM $S_2O_8^{--}$, 0,1 M KCL) und in die andere Kammer wässrige KCL der gleichen Konzentration zugesetzt und danach der Photomultiplierstrom beobachtet. Nach der Zugabe von Peroxodisulfat geht das anfänglich vorhandene Photomultipliersignal genau auf die Hälfte zurück und bleibt während der Lebensdauer der Membrane (bis zu 150 Minuten) konstant.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde zunächst ebenfalls Peroxodisulfat der vorderen Kammer zugegeben (Rückgang des Signals auf den halben Anfangswert). Wird dann ohne Zerstörung der Membrane dieselbe $S_2O_8^{--}$-Menge auch der hinteren Kammer zugesetzt, so fällt das Photomultipliersignal auf den Dunkelwert ab (Fig. 15).

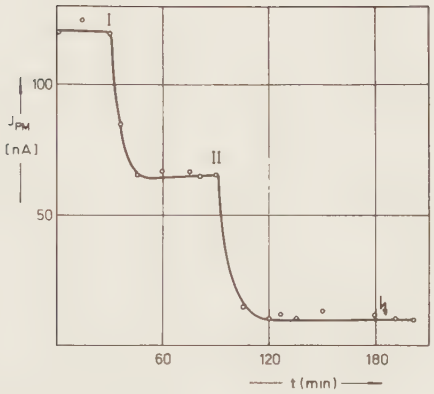


Fig. 15 : Fluoreszenzlöschung durch Zusatz von $K_2S_2O_8$

I : $K_2S_2O_8$ in der hinteren Kammer

II: anschließend $K_2S_2O_8$ in der vorderen Kammer

↯ Membrane zerstört

Diese Versuche liefern einen starken Hinweis darauf, daß das Chlorophyll in den beiden Grenzflächen der Membrane lokalisiert ist. Die sich so ergebende Membranstruktur ist in Fig. 5 dargestellt.

Polarisationsmessungen

Am Abschnitt 4.1 wurde die Möglichkeit einer Energieübertragung betrachtet. Wenn die Chlorophyll-Moleküle genügend nahe zueinander stehen, kann die absorbierte Energie auf ein Nachbarmolekül übertragen werden. Diese Energieübertragung macht sich einerseits durch Fluoreszenzlöschung bemerkbar. Andererseits besteht die Möglichkeit, Energieübertragung durch Messung des Polarisationsgrades der Fluoreszenz nachzuweisen. Bekanntlich ist die Emission von räumlich fixierten, beliebig orientierten Molekülen, die durch linear polarisiertes Licht angeregt werden, ebenfalls teilweise polarisiert. Der gemessene Polarisationsgrad ist nur von der Orientierung des Absorptions- bzw. Emissions-Oszillatoren abhängig[22]. Wenn aber die Moleküle innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes rotieren, oder wenn Energieübertragung zwischen benachbarten Molekülen stattfinden kann, wird der Polarisationsgrad der Fluoreszenz abnehmen. In Abwesenheit einer Molekül-Bewegung ist die Größe einer Depolarisation, ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung. Aus diesem Grunde wurde der Polarisationsgrad p des emittierenden Lichtes gemessen. p ist gegeben durch die Beziehung

$$p = \frac{p_{\parallel} - p_{\perp}}{p_{\parallel} + p_{\perp}}$$

wobei p den Polarisationsgrad und $p_{\parallel}$ bzw. $p_{\perp}$ die Komponenten des emittierenden Lichtes parallel bzw. senkrecht zum Anregungslicht bedeuten (Fig. 16). Die Meßanordnung ist bis auf Anbringen eines Polarisators an der Anregungsseite und eines Analysators an der Emissionsseite die gleiche wie bei der Messung der Fluoreszenzintensität.

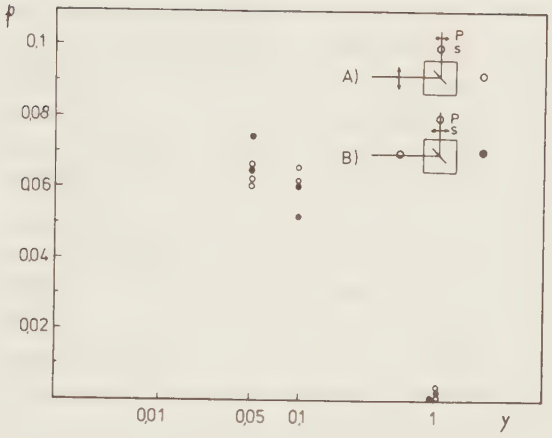


Fig. 16 : Abhängigkeit des Polarisationsgrades vom Mischungsverhältnis Chlorophyll a/Lecithin in n-Dekan;

$$p = \frac{p_{\parallel} - p_{\perp}}{p_{\parallel} + p_{\perp}}$$

Diskussion

Die Messung der relativen Fluoreszenzausbeute in Abhängigkeit von der Chlorophyll-Konzentration in der Membrane zeigt, daß die Intensität der Fluoreszenzausstrahlung bei hoher Chlorophyll-Konzentration (oberhalb $y \simeq 0{,}3$) stark abnimmt. Die Fluoreszenzausbeute ϕ ist definiert als Verhältnis von absorbierter zu emittierter Strahlung. Für eine Gesamtheit von Molekülen, die miteinander oder mit anderen Molekülen in Wechselwirkung stehen, kann der Wert von ϕ von eins abweichen, denn die angeregten Moleküle können ihre Anregungsenergie durch andere Prozesse (Löschprozesse)[23] loswerden. Z.B.: Messungen der Quantenausbeute der Fluoreszenz in Chlorelle-Suspension liefern nach Vermeulen et al.[24] Werte zwischen ϕ = 0,15 % und 0,3 %; diese Werte sind im Vergleich mit der Quantenausbeute in verdünnter Chlorophyll-Lösung, die nach Livingston[25] bei 30 % liegt, sehr klein. Dieser Befund steht offensichtlich in Zusammenhang mit dem hohen Wirkungsgrad des Photosyntheseprozesses.

Die beobachtete Konzentrationslöschung in der Membrane könnte prinzipiell auf das Vorhandensein nicht-fluoreszierender Doppelmoleküle (oder höherer Aggregate) zurückgeführt werden. Diese stehen mit den Einzelmolekülen im Gleichgewicht, und ihre Anzahl nimmt mit der Pigmentkonzentration zu. Nach Förster[26] genügt aber zur Erklärung der Löschung bereits ein sehr geringer Bruchteil fluoreszenzunfähiger Doppelmoleküle, wenn in der Lösung (oder Membrane) Energiewanderung stattfindet, wobei die von einem Einzelmolekül absorbierte Energie schlußendlich auf ein Doppelmolekül gelangt und von diesem strahlungslos vernichtet wird. Eine derartige Energiewanderung findet bekanntlich in großem Ausmaß in den Chloroplasten der grünen Pflanze statt[23]. Der wahrscheinlichste Mechanismus für die Energieübertragung ist der sogenannte Förster-Mechanismus[27] (induktive Resonanz), wodurch eine Energiewanderung zwischen den isolierten Molekülen auch über größere Distanzen stattfinden kann. Zur Erläuterung der Energiewanderung kann man nach Perrin[28] das Elektronensystem eines Moleküls durch ein System von Oszillatoren darstellen. Die schwingende elektrische Ladung bewirkt einerseits eine Kopplung mitdem

Strahlungsfeld und dadurch die Ausstrahlung der Energie in den umgebenden Raum. Andererseits ergibt sich durch elektromagnetische Wechselwirkung eine Kopplung der Oszillatoren benachbarter Moleküle. Diese führt bei einer Übereinstimmung der Frequenzen zu Energieübertragung (analog dem Beispiel zweier mechanisch gekoppelter Pendel). Wenn die Kopplung der Oszillatoren untereinander wesentlich schwächer als die mit dem Strahlungsfeld ist, findet im wesentlichen Ausstrahlung durch den primär angeregten Oszillator statt. Im entgegengesetzten Falle dominiert die Energieübertragung vom ersten Oszillator zum zweiten. Wegen der Abstandsabhängigkeit der gegenseitigen Kopplung ist der erste Fall für große, der zweite für kleine Oszillatorenabstände R realisiert. Bei einem kritischen Abstand R_0 werden die Wahrscheinlichkeiten für Emission und Energiewanderung gleich groß. Für Chlorophyll a in Lösung beträgt dieser Abstand etwa 80 Å. Die Fluoreszenzmessungen an der Membrane haben ergeben, daß von $y \simeq 0{,}2$ an die Fluoreszenzlöschung merklich wird. $y \simeq 0{,}2$ entspricht einer Anzahl Chlorophyll-Moleküle σ pro cm^2 ($\sigma = \frac{1}{2}$) einer Membranseite von $5 \cdot 10^{12}$. Dies entspricht einem mittleren Abstand R zwischen benachbarten Chlorophyll-Molekülen von 50 Å.

Die Energiewanderung durch induktive Resonanz führt bei statistischer Orientierung der Oszillatoren zu einer Depolarisation des Fluoreszenzlichtes. Eine Fluoreszenzdepolarisation würde dagegen nicht eintreten, wenn die Oszillatoren parallel zueinander stehen und innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes feste Orientierung besitzen. In Abwesenheit einer Molekül-Bewegung ist die Größe der Fluoreszenzdepolarisation ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung zwischen benachbarten statistisch orientierten Molekülen. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Polarisation haben Feofilov Sveshnikov[30] für fluoreszierende Farbstoffe in zäher Lösung festgestellt. Die Polarisationsmessungen an der Membrane haben ergeben, daß bei kleiner Chlorophyll-Konzentration der Polarisationsgrad $p = 0{,}065$ beträgt, während bei höhrer Konzentration, bei der starke Fluoreszenzlöschung auftritt, p praktisch gleich Null ist.

Trosper et al.[31] haben bei Untersuchungen an gemischten Chlorophyll/Oleylalkohol-Monoschichten an der Wasseroberfläche einen Grenzwert $p_o \simeq 0{,}05$ gemessen. Auch dieser Wert ist aber immer noch sehr viel kleiner als der Grenzwert p^*, der einer Chlorophyll-Lösung in einem unendlich zähen Medium entspricht ($p^* = 0{,}5$). Aus der Abweichung des gemessenen Polarisationsgrades von p^* ist zu schließen, daß der Porphyrinring des Moleküls sowohl in der Monoschicht wie auch in der Lipidmembrane genügend beweglich ist, um sich innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes ($\tau \simeq 10^{-8}$ sec[32]) wesentlich umorientieren zu können.

Eine Energieübertragung im Sinne des Förster-Mechanismus kann dann zwischen zwei Molekülsorten stattfinden, wenn das Absorptionsspektrum der einen Molekülsorte und das Emissionsspektrum der anderen Molekülsorte sich teilweise überlappen. Es kann aber auch bei fehlender Überlappung eine Energieübertragung zwischen zwei Molekülsorten erfolgen, wenn die Moleküle genügend nah beieinander sind, so daß die Anregungsenergie, bevor Emission stattfindet, durch "Stoß zweiter Art" übertragen werden kann. Bekanntlich absorbiert Vitamin K_1 im sichtbaren Bereich nur schwach[33]. Somit wird Energieübertragung durch induktive Resonanz zwischen Chlorophyll a und Vitamin K_1 ausgeschlossen. Fluoreszenzlöschung in Anwesenheit von Vitamin K_1 beobachteten G.L.Gaines et al.[21] bei der Untersuchung an Chlorophyll-a/Vitamin-K_1-Monoschichten. Sie konnten die Fluoreszenzlöschung als zwischenmolekulare Energieübertragung durch "Stoß zweiter Art" interpretieren. Die Fluoreszenzmessungen an der Membrane zeigen, daß Zusatz von Vitamin K_1 zur membranbildenden Lipid-Chlorophyll-Lösung ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung zur Folge hat.

Die Untersuchungen an bimolekularen Lipid-Chlorophyllmembranen zeigen, daß es sich hierbei um ein geordnetes System handelt. Obwohl die Lipid-Chlorophyllmembranen in ihrer Zusammensetzung wesentlich einfacher sind als die Thylakoidmembranen, bieten sie sich trotzdem als interessantes Modellsystem zur Untersuchung photochemischer Reaktionen von Chlorophyll an, wodurch möglicherweise Erkenntnisse über die Primärprozesse der Photosynthese gewonnen werden können.

Zusammenfassung

Es wurde eine Apparatur entwickelt, welche es gestattet, die Fluoreszenz einer etwa 100 Å dicken chlorophyllhaltigen Lipidmembrane zu messen. Die Dicke solcher Membrane wurde durch Messung der elektrischen Kapazität bestimmt.

Mit Hilfe dieser Apparatur konnte die Anzahl Chlorophyll-Moleküle pro Flächeneinheit der Membrane bestimmt werden.

Durch einseitige chemische Reaktion wurde festgestellt, daß die Chlorophyll-Moleküle in den beiden Grenzflächen der Membrane lokalisiert sind.

Bei hoher Chlorophyll-Konzentration in der Membrane wurde eine Fluoreszenzlöschung und gleichzeitig eine Depolarisation des Fluoreszenzlichtes beobachtet. Beide Befunde deuten darauf hin, daß eine Energieübertragung zwischen benachbarten Molekülen stattfinden kann. Durch Zugabe von Vitamin K_1 tritt ebenfalls Fluoreszenzlöschung auf, die auf eine Energieübertragung von Chlorophyll a auf Vitamin K_1 hinweist.

Literatur-Verzeichnis

1) R.B.Park, "The Chlorophylls"
ed.L.D.Vernon and G.R.Seely
Academie Press New York and London (1966)

2) W.Kreutz Umschau 24, 806 (1966)

3) M.D.Kamen "Primary Processes in Photosynthesis"
Academie Press New York and London (1963)

4) M.Calvin, J.Theor.Biol.2, 258 (1961)

5) P.Müller, D.O.Rudin, H.T.Tien and W.C.Wescott, Nature 194, 979 (1962)

6) T.Hanai, D.A.Haydon and J.Taylor
Proc.Roy.Soc.London, Ser.A 281, 377 (1964)

7) C.Huang, L.Wheeldon and T.E.Thomson
J.Mol.Biol.8, 148 (1964)

8) M.C.Pangborn J.Biol.Chem.188, 471 (1951)

9) E.C.Robles and D.Van den Berg
Biochim.Biophys.Acta 187, 520 (1969)

10) A.S.Holt and E.E.Jacobs
Am.J.Botany 41, 710 (1954)

11) W.D.Bellamy and M.E.Lynch
Gen.Elec.Res.Lab.Report No.63-RL-3469 G (1963)

12) H.T.Tien and A.L.Diana
Chem.Phys.Lipids 2, 55 (1968)

13) K.J.Mysels, K.Shinoda and S.Frankel
"Soap Films, Studies of their Thinning and a Bibliography"
Pergamon Press New York (1959)

14) P.Läuger, W.Lesslauer, E.Marti and J.Richter
Biochim.Biophys.Acta 135, 20 (1967)

15) A.G.Tweet, G.L.Gaines jr. and W.D.Bellamy
J.Chem.Phys. 40, 2596 (1964)

16) C.S.French "Encyclopedia of Plant Physiology"
Vol.5, Part 1, Springer, Berlin 1960, p 282

17) A.Steinemann Dissertation, Basel (1970)

18) M.D.Henninger and F.L.Crane
Biochim.2, 1168 (1963)
19) M.D.Henninger and F.L.Crane
Biochim.Biophys.Acta 75, 144 (1963)
20) R.A.Dilly and F.L.Crane
Plant Physiol. 39, 33 (1964)
21) G.L.Gaines jr,, A.G.Tweet and W.D.Bellamy
J.Chem.Phys. 42, 2193 (1965)
22) G.Weber "Fluorescence and Phosphorescence Analysis"
ed. D.M.Hercules Inter.Pub.
New York, London, Sydney 1966
23) E.Rabinowitch "Photosynthesis and Relatet Processes"
Vol.II, Part 1, p 751 (1951) Inters.Pub.
24) D.Vermeulen, E.C.Wassink and G.H.Renan
Enzymologia 4, 254 (1937)
25) R.Livingston "Handbuch der Pflanzenphysiologie"
W.Ruhland, Springer, Berlin 1960, Vol.5, p.830
26) T.Förster "Fluoreszenz organischer Verbindungen"
Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen 1951
27) J.Perrin 2me Conceil de Chim.
Solvay, Gauthier-Villars, Paris (1925), p.322
29) T.Förster Ann.Physik, 6.Folge 2, 55 (1948)
30) P.P.Feofilov and B.Ya.Sveshnikov
J.Phys.USSR 3, 493 (1941)
31) T.Trosper, R.B.Park and K.Sauer
Photochem.Photobiol. 7, 451 (1968)
32) F.Perrin Ann.Chim.Phys. 12, 169 (1929)
33) O.Isler and K.Doebel
Helv.Chim.Acta 37, 225 (1954

Lebenslauf

Ich, Nasser Alamuti, wurde am 22. Dezember 1937 in Ghazwin/Iran geboren. Die Schulausbildung absolvierte ich in Teheran. 1956 bestand ich das Abitur an der Oberschule Alborz in Teheran. Danach, im Herbst 1956, kam ich nach Deutschland und immatrikulierte mich an der Albert-Ludwig Universität Freiburg/Brg. Nach Erlernen der deutschen Sprache begann ich mit dem Physikstudium und beendete dies im Frühjahr 1965 mit einer Diplomprüfung. Nach einem Jahr übersiedelte ich nach Basel, um unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Läuger (damaliger PD.) eine Dissertation durchzuführen. Vom Sommer 1966 bis zum Frühjahr 1967 führte ich neben meiner Dissertation mit Mitteln des Schweizerischen Nationalfonds wissenschaftliche Arbeiten aus. Im Frühjahr 1967 bekam ich eine Assistentenstelle an der physikalisch-chemischen Anstalt Basel. Vom Januar 1969 bis Oktober 1970 war ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Fachbereich Biologie an der Universität Konstanz.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Dozenten Barner, Bol, Brauer, Flügge, Genzel, Gericke, Görtler, Hönl, Karolus, Lüttringhaus, Maier, Marschall, Osberghaus, Rudolph, Salecker, Schmidt, Sommermeyer, Tautz und Westphal in Freiburg/Brg., und die Herren Dozenten Heilbronner, Läuger und Thürkauf in Basel.